

Biochemisches Fortgeschrittenen- praktikum

Versuch Nummer F-01:
Stereoselektivität enzymati-
scher Reaktionen (EC 1.14.18.1)

Gruppe C

Sven Enterlein
108 097 236 174
Parastoo Nasrollahzadeh
108 096 245 894

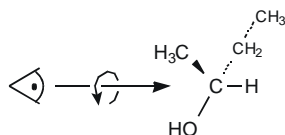
Gliederung:

I. Einleitung.....	2
a) Stereochemie.....	2
b) Stereoselektivität biochemischer Reaktionen	2
c) Das Enzym: EC 1.14.18.1	3
a) Enzymkinetik.....	3
II. Bestimmung der Tyrosinasekonzentration.....	4
a) Versuchsziele, Aufgaben.....	4
b) Versuchsdurchführung	4
c) Messergebnisse.....	5
II. Bestimmung der geeigneten Tyrosinasekonzentration	5
d) Versuchsziele, Aufgaben.....	5
e) Versuchsdurchführung	5
f) Messergebnisse	5
III. Bestimmung der kinetischen Parameter	6
g) Versuchsziele, Aufgaben.....	6
h) Versuchsdurchführung	6
i) Messergebnisse und Beobachtungen	7
j) Auswertung und Diskussion	8

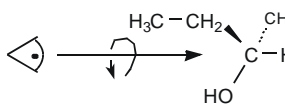
I. Einleitung

a) Stereochemie

Unter dem Begriff der *Stereochemie* versteht man den Verlauf von chemischen Reaktionen, die durch die räumliche Struktur der Moleküle beeinflusst wird. Es gibt Moleküle, die sich nicht mit ihrem Spiegelbild zur Deckung bringen lassen; solche Moleküle nennt man *chiral*. Zwei chirale Moleküle bilden ein *Enantiomerenpaar*. In allen chemischen und physikalischen Eigenschaften stimmen sie überein, ausgenommen die Reaktionen mit



(2 R) - Butanol



(2 S) - Butanol

Abb. I-1: Die CAHN-INGOLD-
PRELOG Regel zur Bestimmung der abs. Konfiguration am Beispiel des 2-Butanols ¹.

ebenfalls chiralen Molekülen (auch Lösungsmitteln!) und der Wechselwirkung mit polarisiertem Licht. Unterscheiden sich die Moleküle aber in der Position ihrer Substituenten, so handelt es sich um *Diastereomere*, die unterschiedliche Eigenschaften besitzen.

Chemische Reaktionen, die bevorzugt mit einem der Enantiomere ablaufen, nennt man *enantioselektiv*. Entsteht bei einer Reaktion eines von mehreren möglichen Stereoisomeren, so heißt die Reaktion *stereoselektiv*.

Für manche Moleküle gibt es eine Art Zwischenstufe: Wenn durch Substitution oder Addition eines Restes an ein achirales Molekül ein chirales entsteht, so nennt man das Edukt *prochiral*. Um zwischen den zwei möglichen chiralen Formen eines Moleküls unterscheiden zu können, definierten CAHN, INGOLD und PRELOG die *absoluten Konfigurationen*. Zur Bestimmung erhalten

die Substituenten des Chiralitätszentrums *Prioritäten*, die zunächst die Ordnungszahlen entsprechen. Ein Beispiel zeigt Abb. I-1. Diese Regeln gelten auch z.B. für die Bezeichnung der Aminosäuren.

b) Stereoselektivität biochemischer Reaktionen

In biologischen Prozessen sind immer Moleküle beteiligt, die eine feste räumliche Anordnung ihrer Atome besitzen. Bei Enzymen bspw. ist die katalytische Aktivität allein auf die exakte Stellung der Aminosäurereste zurückzuführen. Enzyme sind daher immer *chiral*. Besonders wichtig ist der Aufbau des *reaktiven* Zentrums. Bei Enzymen ist dies der Ort der eigentlichen Katalyse. Dort können entweder Ribonukleinsäuren oder Aminosäurereste die Reaktionen steuern. Aufgrund der festgelegten Struktur ist die Selektivität meistens sehr hoch (es gibt aber auch „tolerante“ Enzyme). Als Substrate kommen bevorzugt (oder ausschließlich) solche in Frage, die ebenfalls eine bestimmte räumliche Struktur besitzen. Als einfachstes Modell dient das Schlüssel-Schloss Prinzip. Oft geht jedoch eine konformative Änderung des Enzyms mit der Bindung einher; diesen Vorgang nennt man *induced fit*.

Es ist also nicht erstaunlich, dass unterschiedliche Stereoisomere unterschiedliche Bindungseigenschaften besitzen. In unserem Versuch soll die Kinetik der enantiomeren Verbindungen L und D-DOPA (3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-alanin) (Abb. I-2) sowie deren Racemat D,L-DOPA untersucht werden.

Das Enantiomer mit der höheren Aktivität nennt man *Eutomer*, das mit der geringeren *Distamer*. Das Verhältnis der beiden wird *eudismisches Verhältnis* und dessen Logarithmus *eudismischer Index* genannt.

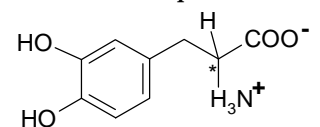


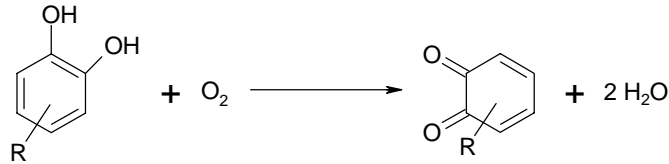
Abb. I-2: Strukturformel von DOPA. Das Chiralitätszentrum ist mit einem Sternchen * gekennzeichnet.

¹ Quelle: CD Römpp Chemie Lexikon, Version 1.0

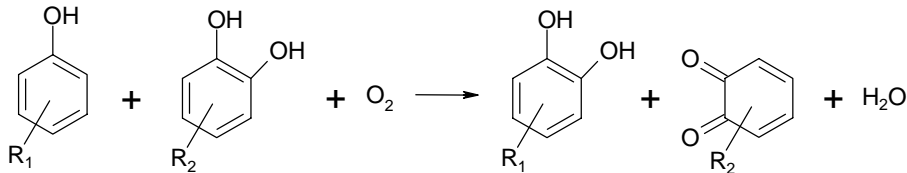
c) Das Enzym: EC 1.14.18.1

Das für den Versuch verwendete Enzym ist in die Hauptklasse der *Oxidoreduktasen* eingeteilt. Es katalysiert also Redoxreaktionen. Es handelt sich um eine *Tyrosinase*, die zwei Reaktionen katalysieren kann, und daher auch zwei unterschiedliche Bezeichnungen erhalten hat.

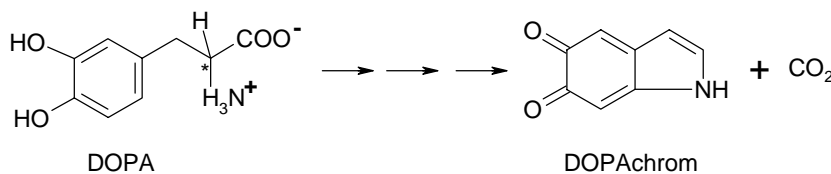
1. Catecholoxidase (EC 1.10.3.1): 1,2-Benzendioal: O_2 -Oxidoreduktase



2. Monophenolmonooxygenase (1.14.18.1): DOPA: O_2 -Oxidoreduktase:

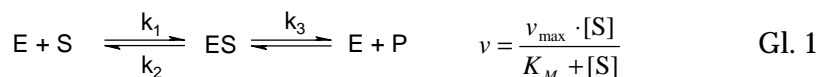


Weitere Merkmale und Eigenschaften des Enzyms sind im Folgenden beschrieben. Ein interessantes Merkmal ist, dass das Kupfer-Ion keinem Valenzwechsel unterliegt, wie es in vielen anderen metallhaltigen Oxidoreduktasen der Fall ist. Für die Größe des Enzyms liegen unterschiedlich Angaben vor, die von 125 kD bis 128 kD reichen. Transferiert man das Enzym mit 128 kD von einem 10^{-2} M Phosphatpuffer in einen 5×10^{-3} M, so nimmt die Molekülmasse auf 119 kD ab. Die Tyrosinase liegt als Tetramer aus vier Untereinheiten vor, von denen jede 32 kD schwer ist und ein gebundenes CuO^+ enthält. Der Nachweis der enzymatischen Aktivität erfolgt über die Reduktion von DOPA zu DOPAchrom, das eine maximale Absorption bei 475 nm aufweist:



a) Enzymkinetik

Klassischerweise erfolgt die Auswertung kinetischer Parameter über die MICHAELIS-MENTEN Gleichung:



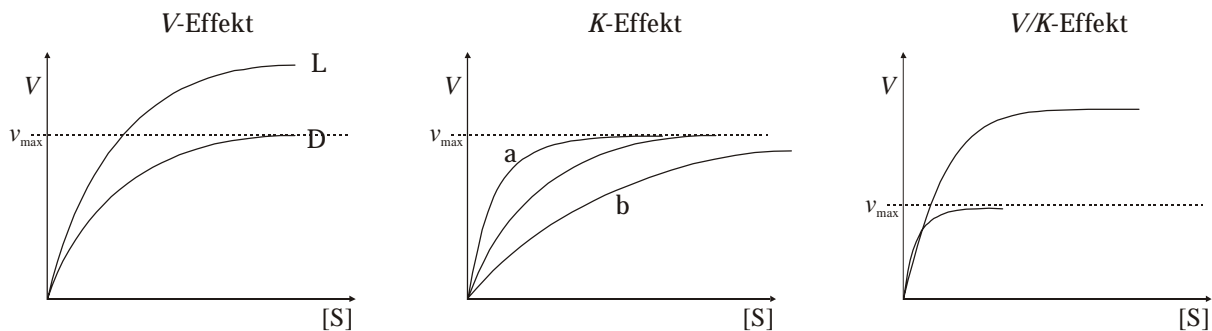
Ein weiterer wichtiger Parameter ist die *katalytische Konstante* k_{cat} ; sie ist definiert als Anzahl der Reaktionsschritte, die eine Bindungsstelle des Enzyms pro Zeiteinheit katalysiert. Deshalb heißt sie auch *Wechselzahl* oder *turnover number*.

$$k_{\text{cat}} = \frac{v_{\max}}{[\text{E}]_T}$$

Im einfachsten Fall der MICHAELIS-MENTEN Gleichung ist $k_{\text{cat}} = k_3$, ansonsten sind zusätzliche Informationen notwendig. Die beiden Parameter v_{\max} und K_M einzeln betrachtet sind kein Maß für die katalytische Aktivität (*Affinität*), wohl aber deren Quotient $\frac{v_{\max}}{K_M}$

und damit auch das Verhältnis der Wechselzahl zur MICHAELIS-Konstanten $\frac{k_{cat}}{K_M}$. In unserem Fall nähern wir die kat. Konstante durch den Ausdruck $\frac{v_{max}}{K_M}$ an.

Enzyme können häufig mehr als ein Substrat binden, was zur Konkurrenz der verschiedenen Substrate führt. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von *Inhibition*, da das Enzym veränderte Kinetiken aufweist. Mögliche Unterschiede in der Auftragung von V gegen $[S]$ sind im folgenden abgebildet.



Je nach Problemstellung ist es günstig, andere Auftragungen zu wählen. Übliche Gleichungen sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Gleichung	Name	
$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{max}} + \frac{K_m}{v_{max}} \cdot \frac{1}{[S]}$	Lineweaver-Burk	Gl. 2
$v = v_{max} - K_m \cdot \frac{v}{[S]}$	Eadie-Hofstee	Gl. 3
$\frac{[S]}{v} = \frac{K_m}{v_{max}} + \frac{1}{v_{max}} \cdot [S]$	Hanes	Gl. 4

Tab. I-1: Alternative Auftragungsmöglichkeiten zur Bestimmung kinetischer Parameter. Vorteil ist die lineare Form der Gleichungen.

II. Bestimmung der Tyrosinasekonzentration

a) Versuchsziele, Aufgaben

Um die katalytische Konstante ausrechnen zu können, muss die genaue spezifische Aktivität bekannt sein. Dazu bestimmt man die Konzentration photometrisch nach folgender empirischen Formel:

$$E_{280}^{1\%} = 24.9$$

Das bedeutet, dass die Extinktion bei 280 nm pro enthaltenem Prozent Tyrosinase um 24.9 Einheiten steigt. Dies soll in diesem Teil erfolgen.

b) Versuchsdurchführung

Es sollte eine Enzymlösung hergestellt werden, die etwa 100 units pro ml enthalten sollte. In weiteren Messungen (s.u.) stellte sich diese Menge als unzureichend heraus, so dass wir eine Lösung von ca. 470 units pro ml benutzten. Dazu berechnet man zunächst aus der Packungsangabe von 5300 units/mg die nötige Menge an Protein, löst diese in dem Phosphatpuffer (0.1 M, pH 7) und misst die Extinktion bei 280 nm.

c) Messergebnisse

Wir erhielten eine Extinktion von 0.218, was einer Tyrosinaseaktivität von 468 unit/ml entspricht.

II. Bestimmung der geeigneten Tyrosinasekonzentration

a) Versuchsziele, Aufgaben

Nachdem die Konzentration bekannt ist, muss die für die Bestimmung der kinetischen Parameter günstigste Tyrosinasekonzentration herausgefunden werden. Zunächst wird die Autooxidation des DOPA bestimmt, um systematische Fehler zu vermeiden. Danach werden von verschiedenen Verdünnungen der Tyrosinaselösung die Extinktionen bei 492 nm gemessen. Eine gute Geschwindigkeit ist ca. 0.15 Extinktionseinheiten pro Minute.

b) Versuchsdurchführung

Für die Bestimmung der Autooxidation werden 1.0 ml 0.015 mM L-DOPA Lösung zu 1.95 ml Phosphatpuffer in eine Küvette pipettiert und nach kurzem Umschwenken damit das Photometer auf Null kalibriert. Über drei Minuten wird die Extinktion alle 30 s abgelesen. Stellt man keine Änderung fest, so können die weiteren Messergebnisse ungeändert übernommen werden. Ansonsten ist jedes Mal eine Messung notwendig, um die erhaltenen Werte korrigieren zu können (d.h. die Autooxidationswerte werden subtrahiert).

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt nach folgendem Pipettierschema:

Reagenz/ml	Küvette					
	1	2	3	4	5	6
Phosphatpuffer	1.95	1.90	1.80	1.70	1.60	1.50
L-DOPA	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyrosinase	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50

Bei Tyrosinase-Zugabe wird die Zeitmessung gestartet und über einen Zeitraum von 5 min alle 30 s die Extinktion notiert.

c) Messergebnisse

Die ersten drei Minuten ergaben sich keine Änderungen in der Extinktion, weshalb wir keine Korrektur an den Messwerten vornehmen mussten. Diagramm II-1 stellt den zeitlichen Verlauf der Extinktionsänderungen dar. Hier sollen nur die Geschwindigkeiten der einzelnen Ansätze aufgeführt werden:

	1	2	3	4	5	6
v_{linear}	0.007	0.012	0.069	0.105	*	0.140

* wurde ausgelassen, da vorige Konzentrationen viel zu niedrig.

Wie man sieht, weist Ansatz 6 die der Empfehlung ähnlichste Geschwindigkeit auf, weshalb wir in den folgenden Versuchen immer ein Volumen von 0.5 ml an Tyrosinase zugeben.

Bestimmung der optimalen Tyrosinase-Konzentration (2)

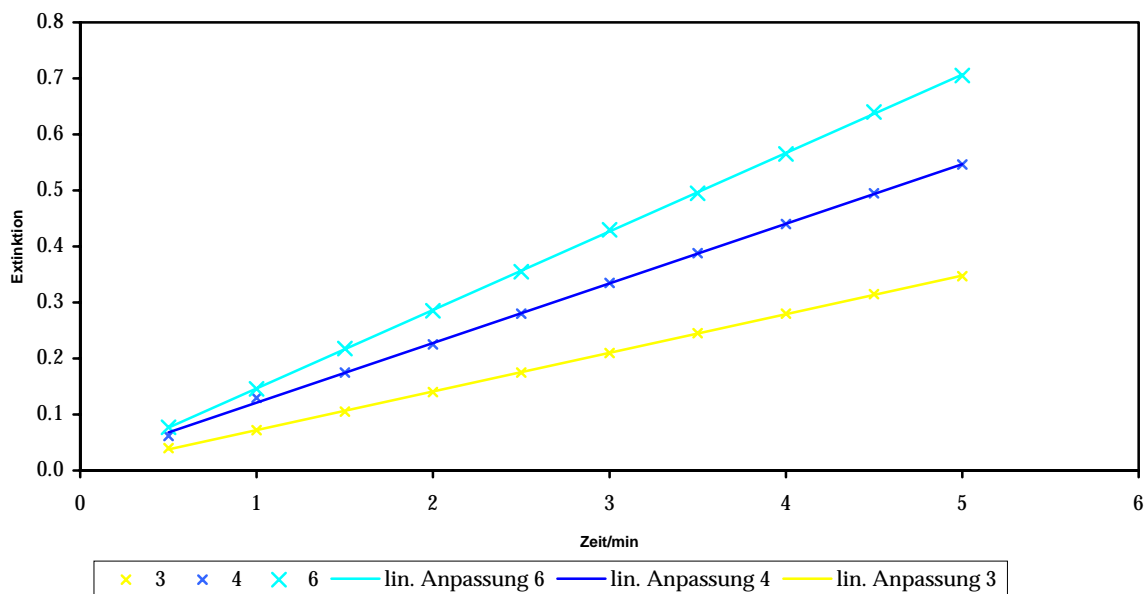


Diagramm II-1: Die ersten beiden Ansätze zeigten eine viel zu niedrige Änderungsgeschwindigkeit; sie wurden deshalb nicht berücksichtigt. Die Zahlen geben die Küvetten-Nummer wieder.

III. Bestimmung der kinetischen Parameter

a) Versuchsziele, Aufgaben

Mit Hilfe der in der Einleitung unter d) beschriebenen Gleichungen sollen die Michaelis-Konstante K_M , die max. Umsetzungsgeschwindigkeit v_{\max} und katalytische Konstante k_{cat} bestimmt werden. Diese werden von den enantiomeren Verbindungen L- und D-DOPA sowie deren Racemat D,L-DOPA ermittelt und verglichen.

b) Versuchsdurchführung

Die Durchführung verläuft analog zu der vorigen. Es werden drei Mal sechs Ansätze untersucht, die steigende Substratkonzentrationen (D-DOPA, L-DOPA und D,L-DOPA) enthalten:

Reagenz/ml	Küvette					
	0	1	2	3	4	5
Phosphatpuffer	2.45	2.40	2.30	2.10	1.70	1.50
DOPA	0.025	0.05	0.10	0.20	0.40	0.80
Tyrosinase	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50

Der Puffer und das Substrat werden in die Küvette pipettiert, geschwenkt und als Nullstandard verwendet. Nach Zugabe des Enzyms startet die Zeitmessung, und 5 min lang werden alle 30 s die Extinktionswerte notiert.

c) Messergebnisse und Beobachtungen

In den folgenden Diagrammen sind die aufgenommenen Extinktionskurven abgebildet. Die Datenblätter befinden sich am Ende.

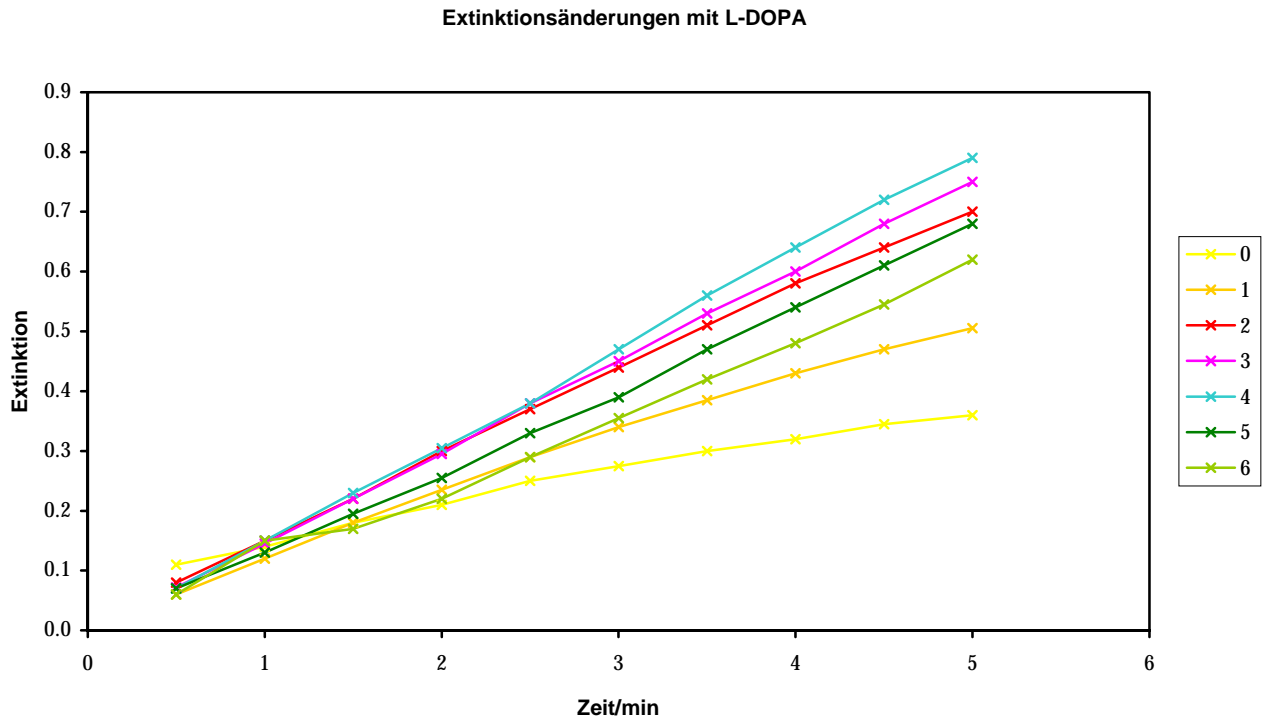


Diagramm III-1: Änderungen der Extinktion bei Verwendung von L-DOPA als Substrat.

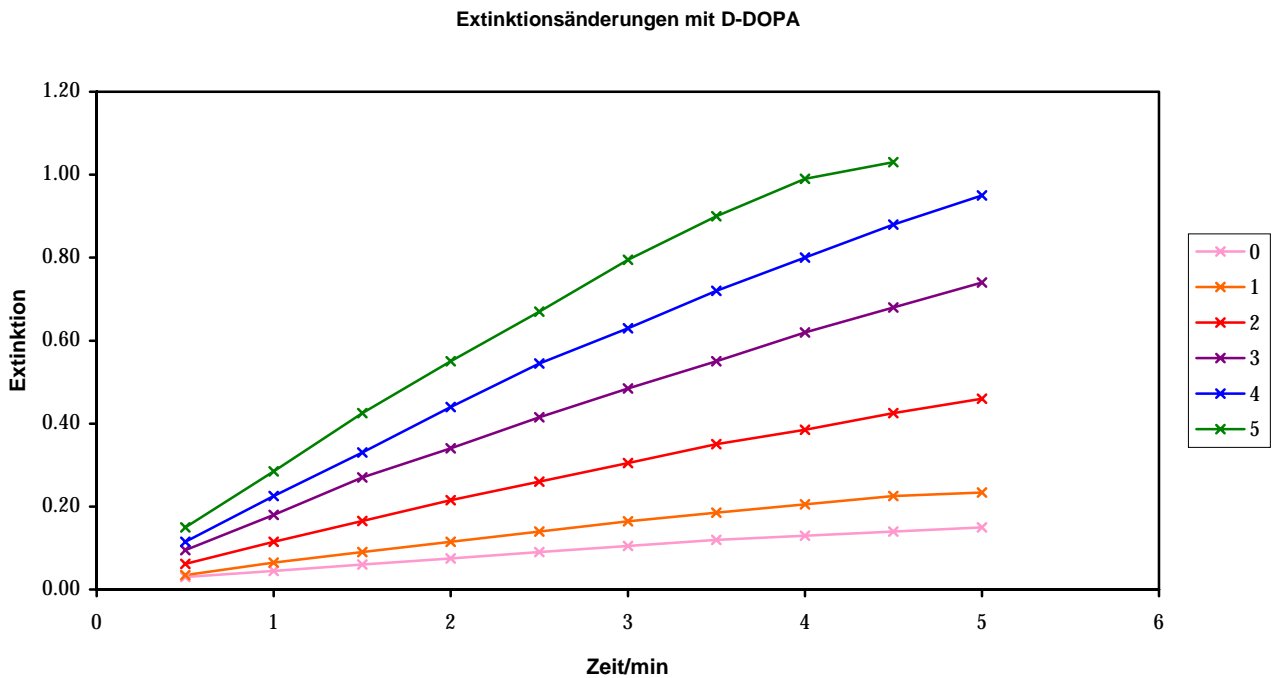


Diagramm III-2: Änderungen der Extinktion mit D-DOPA als Substrat.

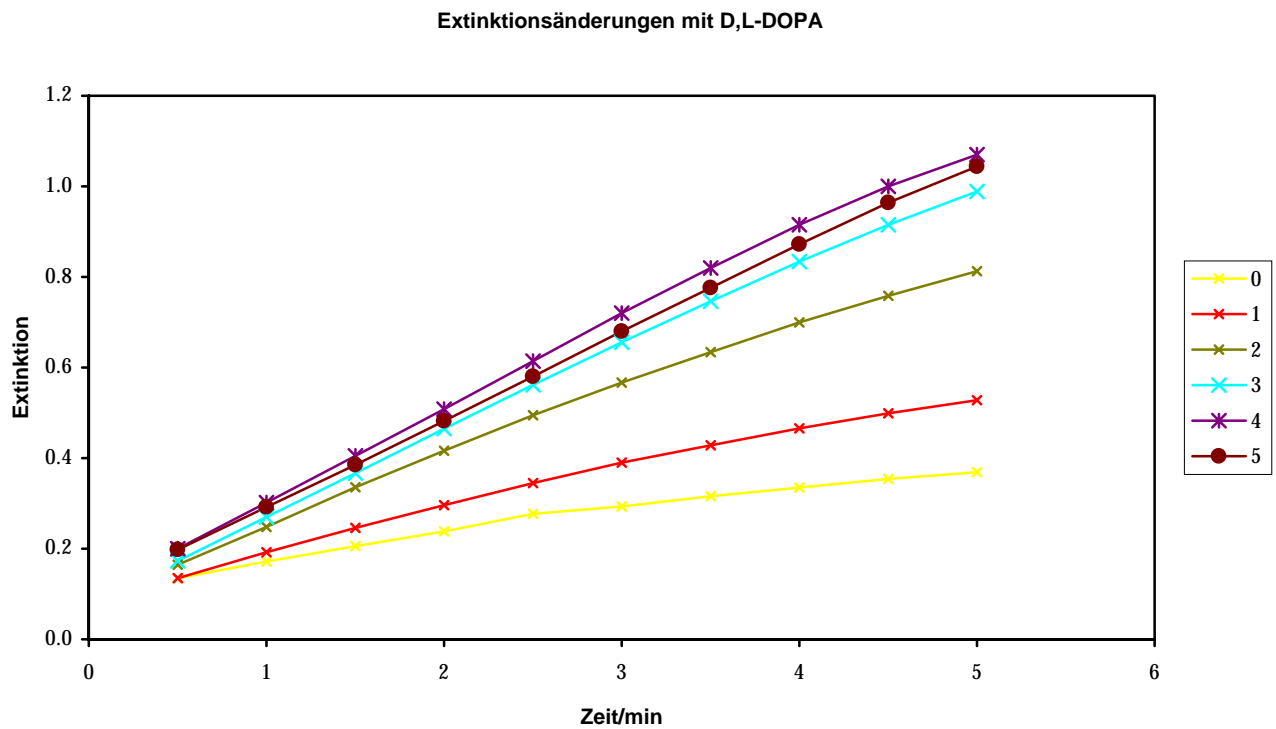


Diagramm III-3: Änderungen der Extinktion mit D,L-DOPA als Substrat.

d) Auswertung und Diskussion

Die Werte der kinetischen Parameter sind bei den linearen Gleichungen Gl. 2 – Gl. 4 numerisch errechnet. Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse wieder.

		v_{\max} / min	K_M / mM	$\frac{v_{\max}}{K_M}$		$v_{\max} / \text{min}^{-1}$	K_M / mM	$\frac{v_{\max}}{K_M}$
Hanes								
1. Messung		0.178	2.08E-04	856.		0.308	1.26E-03	244.5
2. Messung		0.176	1.99E-04	887.		0.256	1.69E-03	151.4
Median		0.178	2.03E-04	876.		0.322	1.36E-03	237.1
Lineweaver-Burk								
1. Messung	D-DOPA	0.168	2.30E-04	732.	L-DOPA	0.252	9.63E-04	262.2
2. Messung		0.171	2.39E-04	715.		0.366	1.54E-03	237.4
Median		0.170	2.28E-04	744.		0.295	1.22E-03	242.1
Eadie-Hofstee								
1. Messung		0.189	2.54E-04	744.		0.291	1.15E-03	252.4
2. Messung		0.190	2.56E-04	741.		0.290	1.14E-03	254.6
Median		0.190	2.55E-04	745.1		0.300	1.20E-03	249.4
Mittelwerte		0.179	2.30E-04	782.5		0.298	1.28E-03	236.8

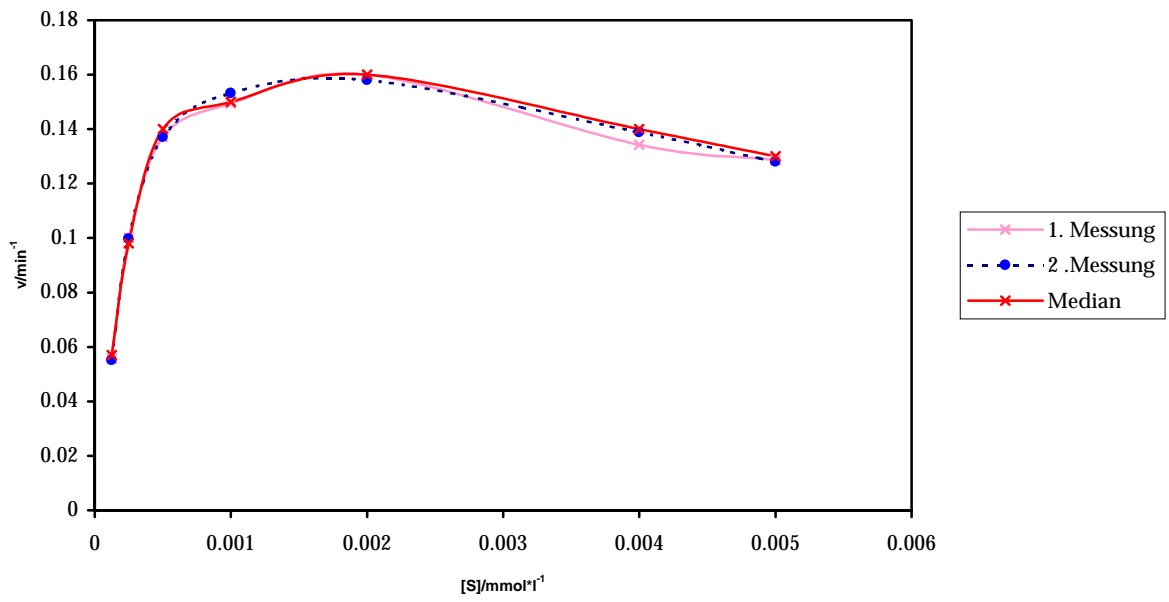
		v_{\max} / min	K_M / mM	$\frac{v_{\max}}{K_M}$
Hanes				
1. Messung		0.243	4.07E-04	598.7
2. Messung		0.253	7.68E-04	329.6
Median		0.251	4.46E-04	563.0
Lineweaver-Burk				
1. Messung	D,L-DOPA	0.283	5.58E-04	506.9
2. Messung		0.298	6.01E-04	496.6
Median		0.337	7.67E-04	439.6
Eadie-Hofstee				
1. Messung		0.234	3.96E-04	590.6
2. Messung		0.232	3.85E-04	603.1
Median		0.237	4.07E-04	581.8
Mittelwerte		0.263	5.26E-04	523.3

Wie man auch an den Diagrammen sehen kann, sind die Messungen nahezu gleich und weichen meistens nicht stark vom Median ab. Auffallend ist, dass sich trotz unterschiedlicher Werte für K_M bzw. v_{\max} das Verhältnis kaum unterscheidet. Um eine noch bessere Aussage über die Streuung machen zu können, verwendet man den YODIN-Plot. Bei diesem trägt man den Median der Messergebnisse einer Größe als Balken auf und fügt die einzelnen Messwerte zusätzlich als Punkte ein. Diese Darstellungsweise ist als erstes Diagramm auf der folgenden Seite zu sehen. Dort erkennt man nochmals die teilweisen Abweichungen der einzelnen Ergebnisse. Bei den wenigen Messungen, die wir durchgeführt haben, wäre eine Regression per Augenmaß besser gewesen als eine numerische.

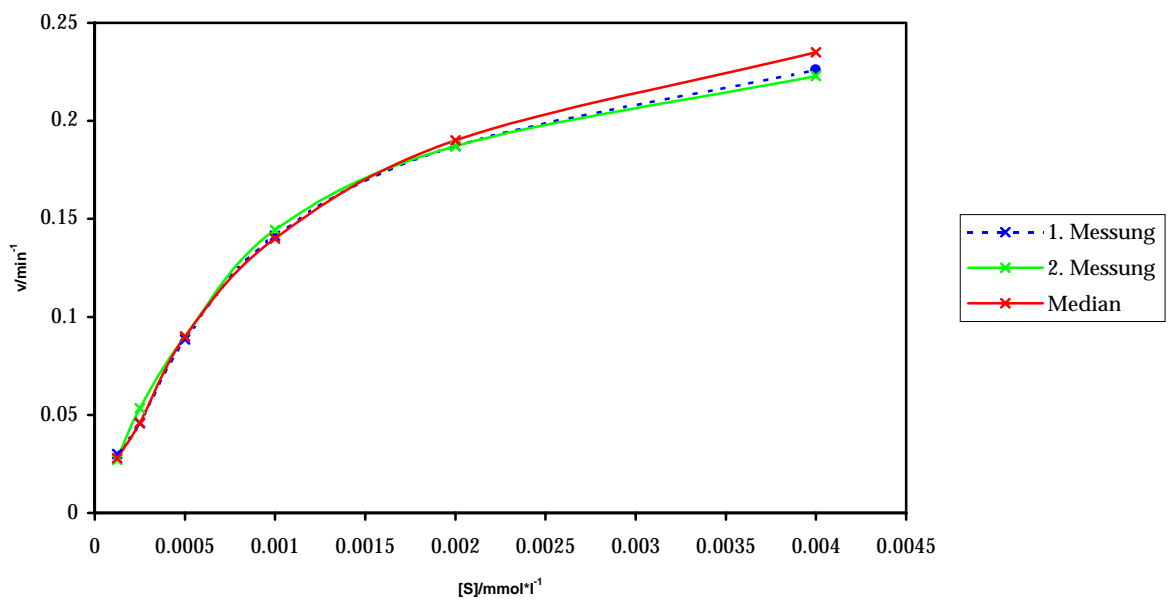
Das eudismische Verhältnis beträgt 3.22, und somit der eudismische Index 0.52. Diese Werte stimmen mit den Werten gut überein, die Herr Femfert bestimmt hat.

(Diagramm „Youdin“ aus Excel-Dokument)

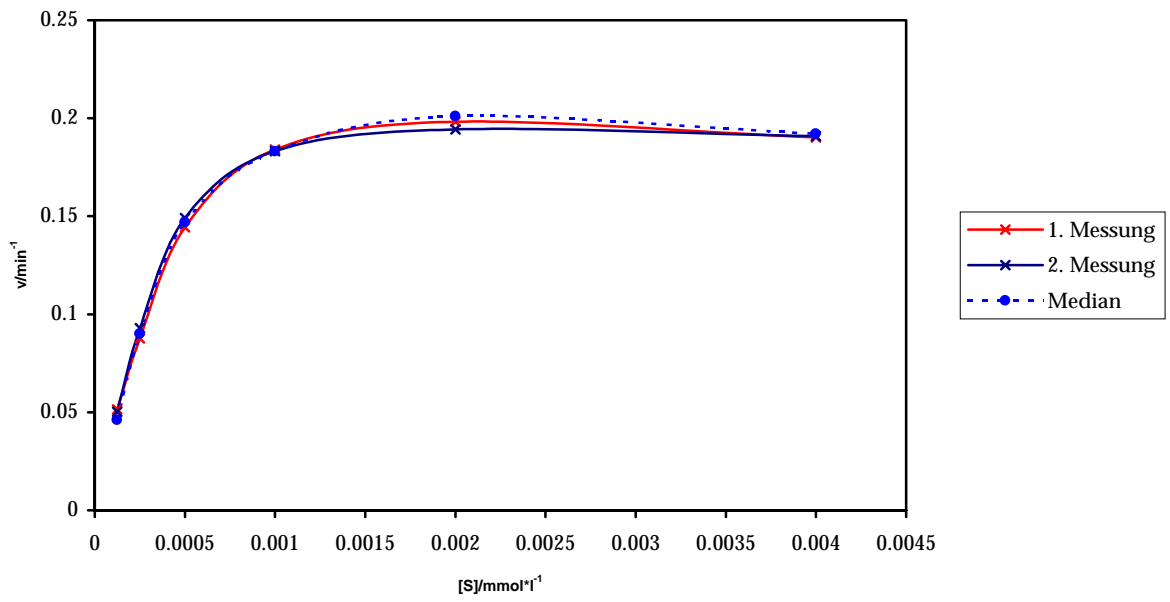
Michaelis-Menten Auftragung (L-DOPA)



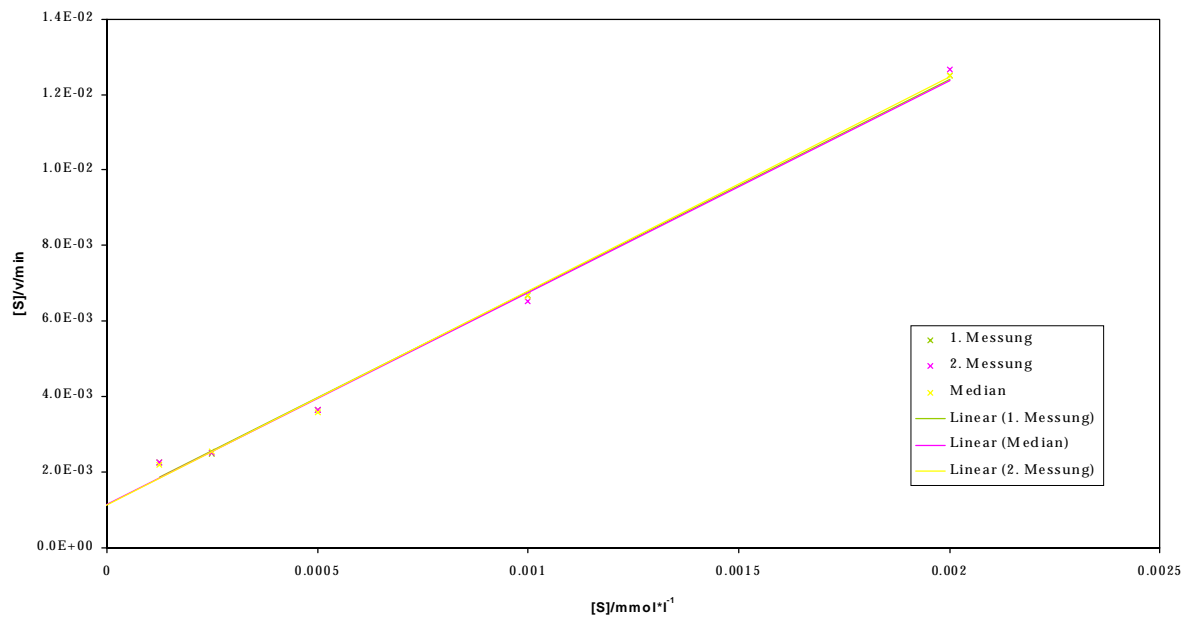
Michaelis-Menten Auftragung (D-DOPA)



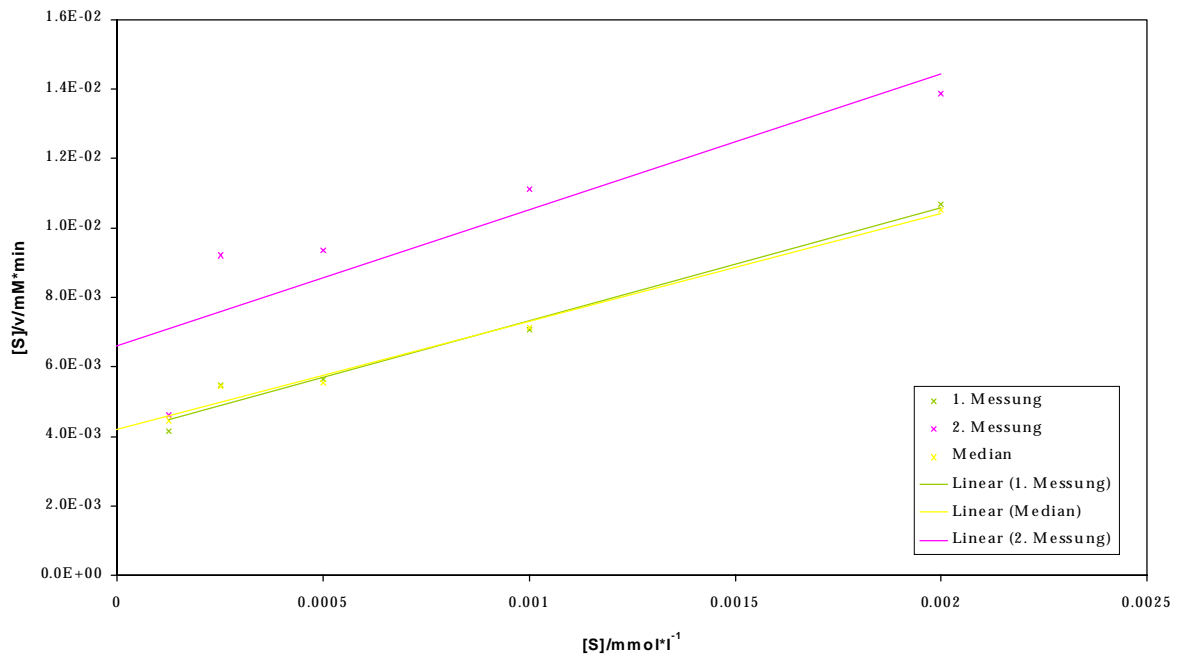
Michaelis-Menten Auftragung (D,L-DOPA)



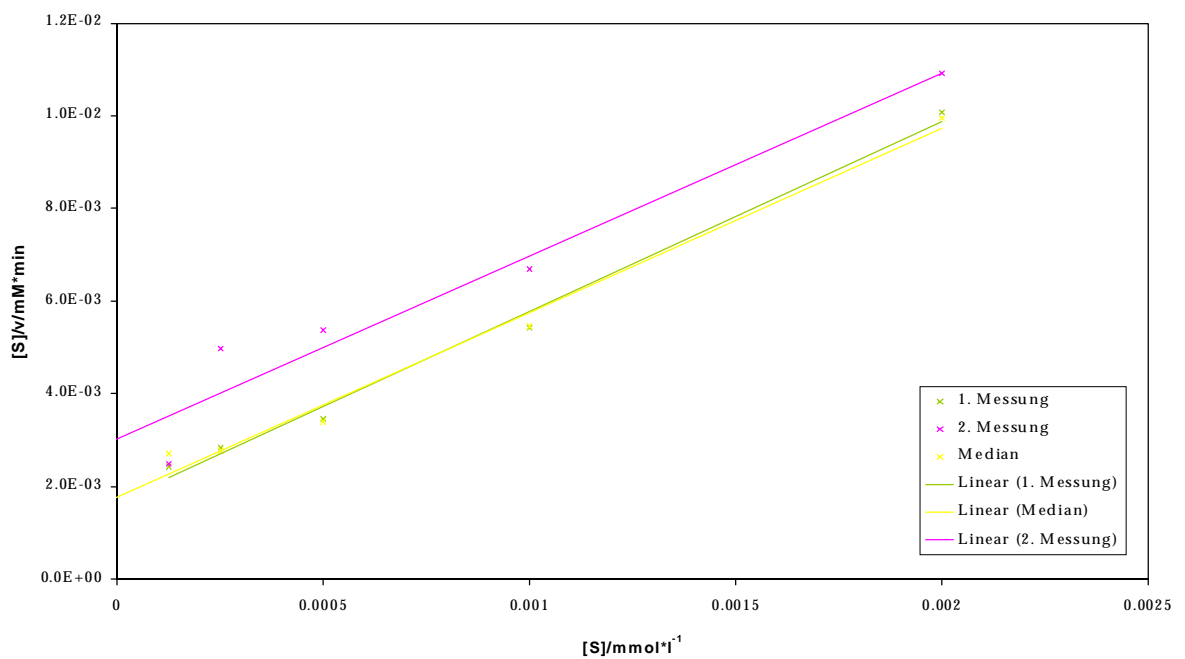
Hanes-Plot (L-DOPA)



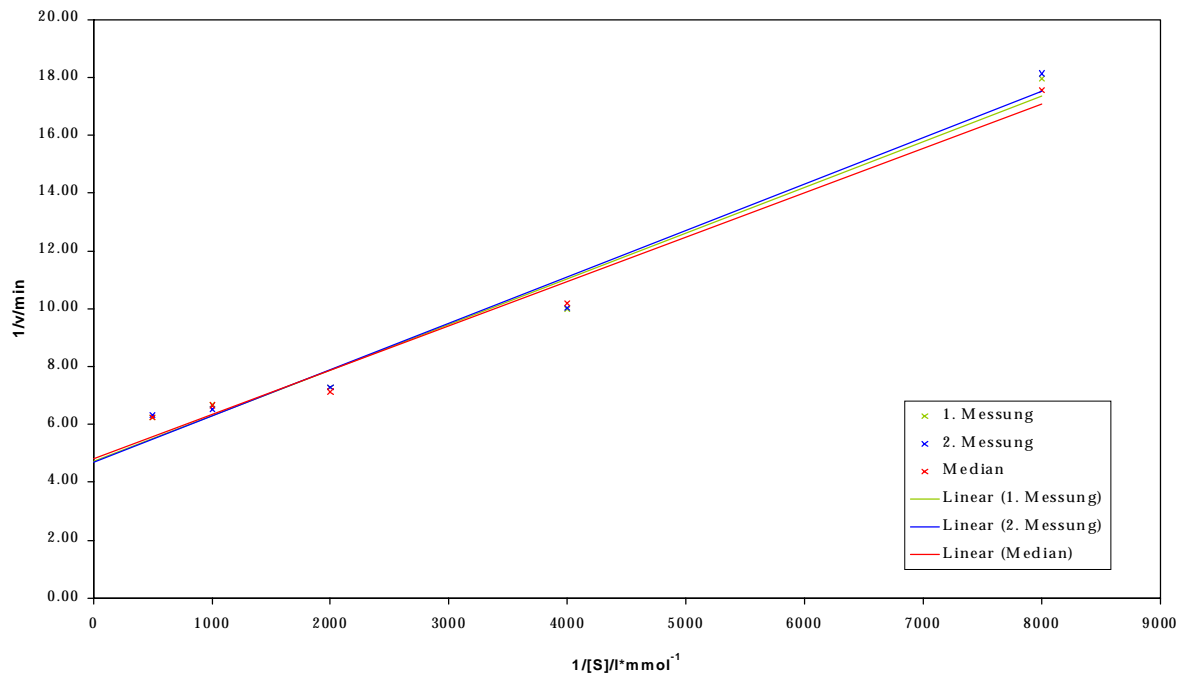
Hanes-Plot (D-DOPA)



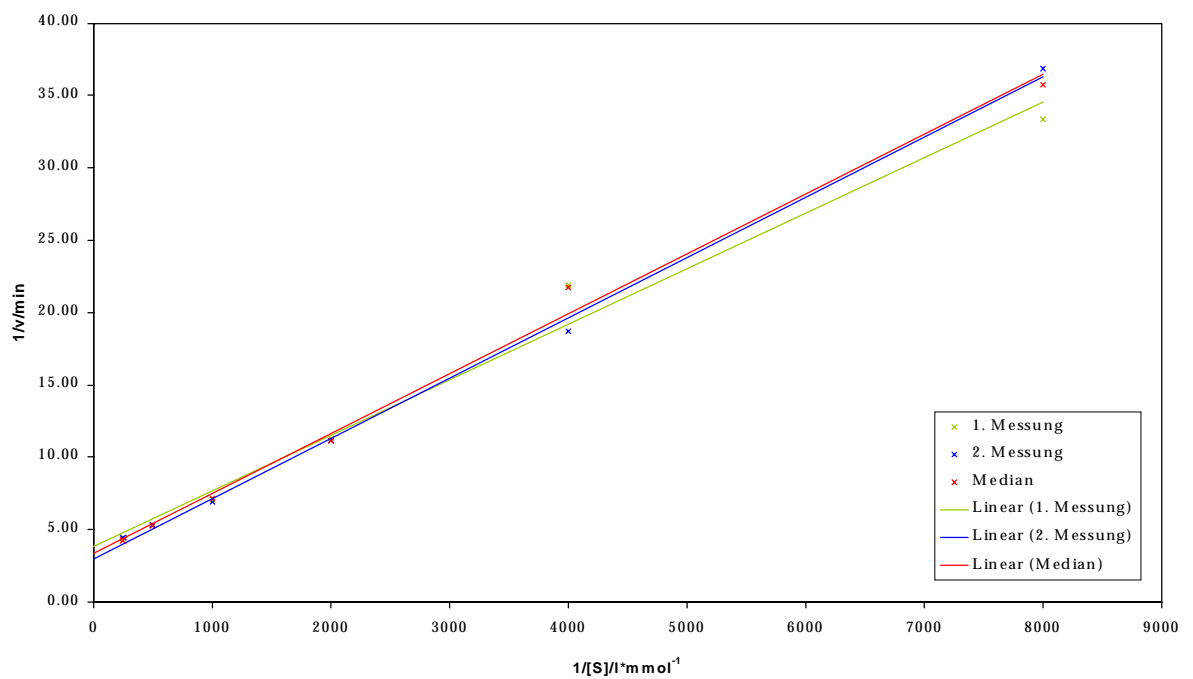
Hanes-Plot (D,L-DOPA)



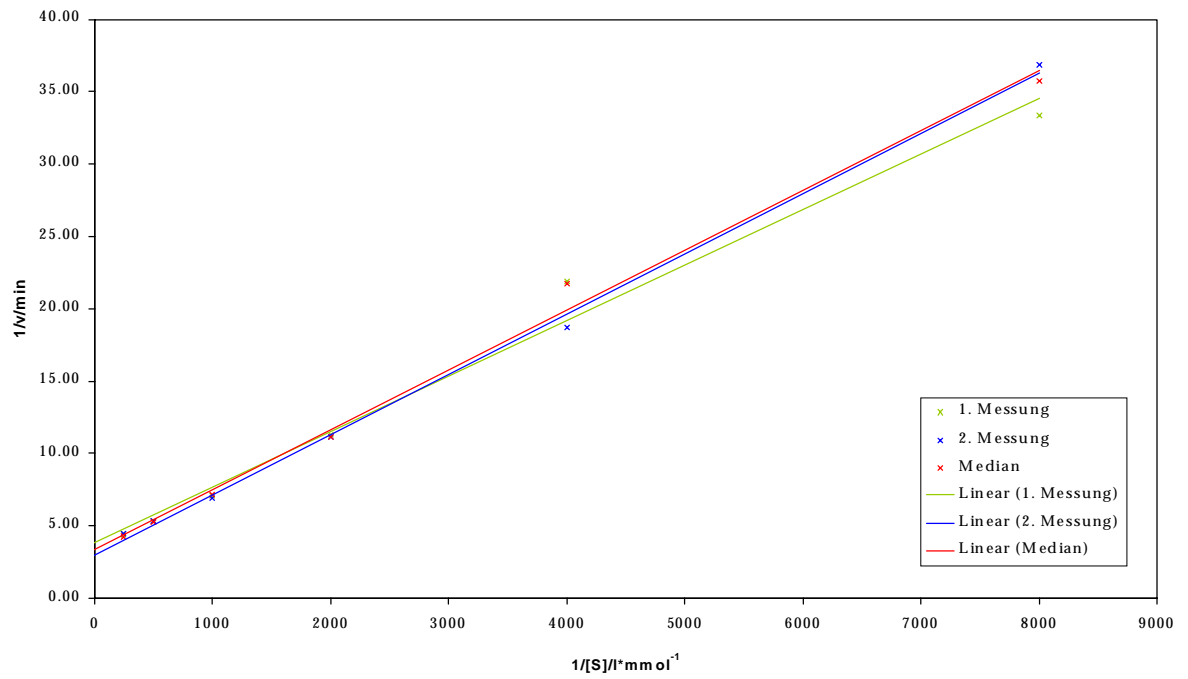
Lineweaver-Burk-Plot (L-DOPA)



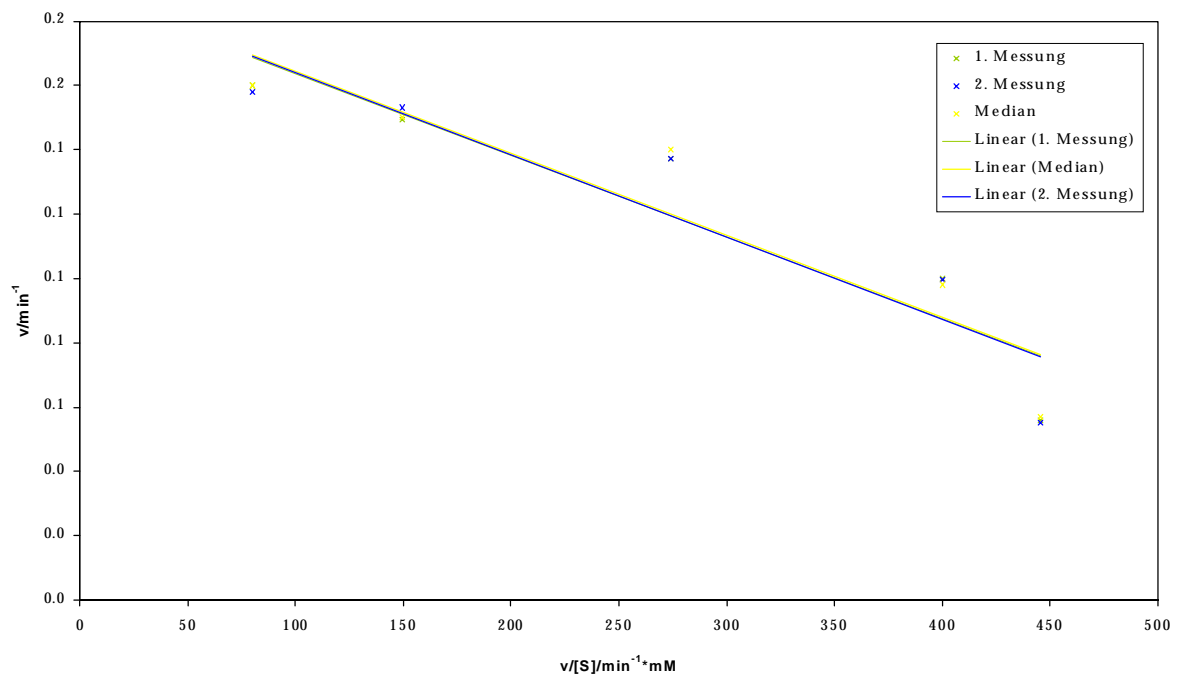
Lineweaver-Burk-Plot (D-DOPA)



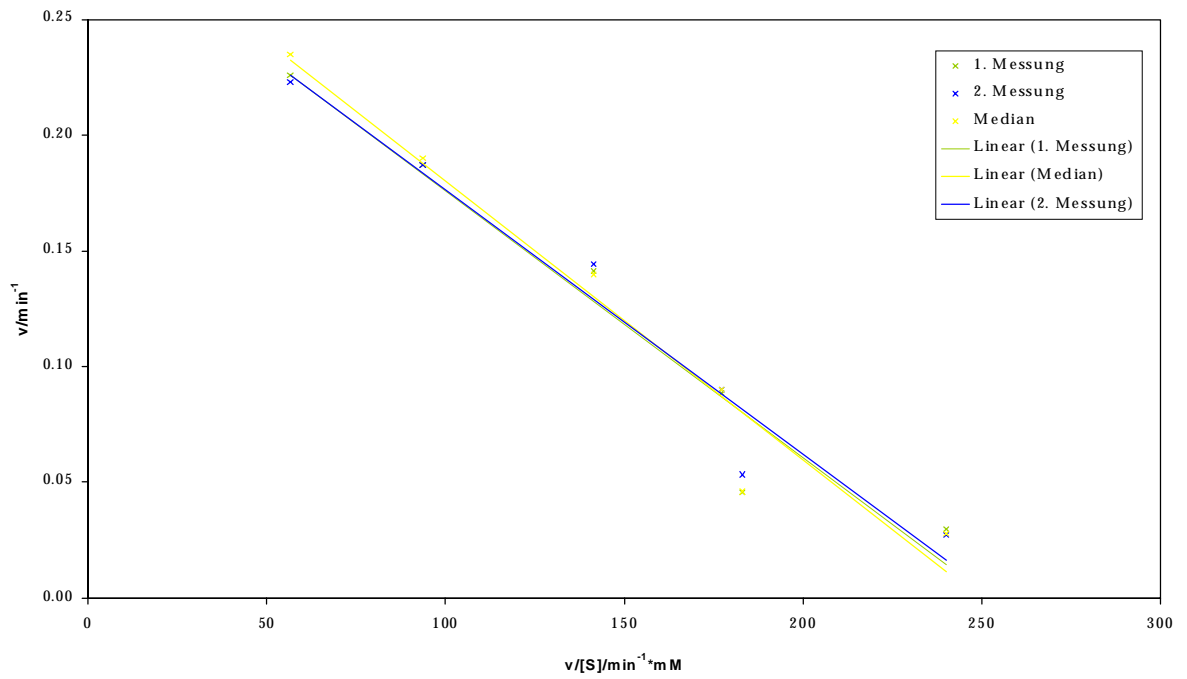
Lineweaver-Burk-Plot (D,L-DOPA)



Eadie-Hofstee-Plot (L-DOPA)



Eadie-Hofstee-Plot (D-DOPA)



Eadie-Hofstee-Plot (D,L-DOPA)

